

文章编号: 1002-2694(2005)09-0762-03

多重反转录聚合酶链反应检测 H5 亚型 禽流感病毒方法的建立*

庞耀珊, 谢芝勋, 邓显文, 唐小飞, 刘加波

摘要:目的 根据 A 型 AIV 的 M 基因和 HA 基因序列, 设计了两对引物。其中 XZ145-2 和 XZ146 为通用引物, 可检测所有 A 型 AIV, 跨幅为 244bp; XZH5-1 和 XZH5-5 为 H5 亚型 AIV 特异性引物, 跨幅为 860 bp。通过对多重 RT-PCR 扩增条件的优化, 建立了快速检测鉴别 H5 亚型 AIV 多重 RT-PCR。该多重 RT-PCR 对 H5 亚型 AIV 同时扩增出两条大小分别为 244 bp 和 860 bp 的 cDNA 片段, 对其他 A 型 AIV 只扩增出 244 bp 的 cDNA 片段, 对其它常见禽病病原体无 244 bp 和 860 bp cDNA 片段出现。该多重 RT-PCR 对 H5 亚型 AIV RNA 最低检出量为 10pg。该多重 RT-PCR 对 AIV 人工感染鸡临床样品和鸡胚分离物进行检测, 结果其检出率为 100%。

关键词:多重; 聚合酶链反应; 禽流感病毒; H5 亚型

中图分类号:S852.65 **文献标识码:**A

Development of multiplex reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of H5 subtype avian influenza virus

PANG Yao-shan, XIE Zhi-xun, Deng Xian-wen, Tang Xiao-fei, LIU Jia-bo

(Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning, 530001, China)

ABSTRACT: A multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was developed and optimized for use to detect the H5 subtype of avian influenza virus (AIV). For this purpose, two sets of specific oligonucleotide primers were designed, of which one set of primer, XZ145-2 and XZ146, based on the highly conserved region of the matrix gene was found to be able to amplify the cDNA bands of 244 bp for all AIV, and the other one, XZ-H5-1 and XZ-H5-5, based on the relatively conserved region of the hemagglutinin in gene of H5 subtype could be used merely to amplify the cDNA bands of the 860 bp of AIV H5 subtype. The results by using this specific multiplex RT-PCR demonstrated that two specific cDNA bands of 244 bp and 860 bp were observed simultaneously only for RNA isolated from AIV H5 subtype, and one specific cDNA band of 244 bp was found for RNA isolated from other subtypes of AIV. No specific cDNA band of 244 bp or 860 bp could be detected for RNA/DNA isolated from other avian pathogens or tissues of SPF embryos after amplification. The minimal amount as detected by this multiplex RT-PCR was 10 pg of AIV-H5 RNA. The results of this method for the detection of isolates of H5 subtype of AIV were completely matched to those of the classical virus identification methods.

KEY WORDS: multiplex; polymerase chain reaction; avian influenza virus; H5 subtypes

禽流感病毒(AIV)属于 A 型流感病毒, 除了可感染禽类外, 还可感染人、猪和马等多种动物, 为 A 类动物传染病。AIV 基因组由包括 M 基因和 HA 基因在内的 8 个负链单股 RNA 片段组成。其中 M 基因组序列高度保守, HA 基因组则可变性很强, 其某些位点的变异可导致不同 HA 亚型的出现。目前 A 型流感病毒有 15 个 HA 亚型, 其中 H5 是高致病性亚型, 常给养禽业带来严重经济损失^[1-2]。病毒分离、血清学试验至今仍是诊断 AI 和对 AIV 进行定型普遍采用的方法。但这些方法操作繁琐复杂,

难以对 AI 进行快速诊断, 十分不利于 AI 的防制。聚合酶链式反应(PCR)是一种体外基因扩增技术, 可以在数小时内对某段基因进行扩大数百万倍。该技术特异性强、敏感性高, 检测快速, 已被广泛应用于生命科学的各个领域。国际兽疫局也将 PCR 技术列为多种病原可靠的检测方法。多重 PCR 是一种特殊 PCR 形式, 其最突出特点, 即一次 PCR 反应可同时检测、鉴别出多种病原体, 在临床多种病原混

* 广西科技攻关项目(桂科攻 023001-4)和广西留学基金项目(桂科回 0236005)。

作者单位: 广西壮族自治区兽医研究所, 南宁 530001

合感染的鉴别诊断上具有其独特优势^[3-4]。本研究根据 RT-PCR 技术原理,研究建立了 H5 亚型 AIV 的多重 RT-PCR 检测鉴别技术。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 试验用毒株 13个 H5 亚型和6个 H9 亚型 AIV 毒株,由本实验室从鸡、鸭、鹅等家禽中分离并鉴定;DNV F48、IBV M41、ILTV 及 MG S6,由本实验室保存;H7N1 RNA,由美国宾夕法尼亚大学禽病诊断研究室惠赠。

1.2 生化试剂 Trizol RNA 抽提试剂,购自 GIBCO 公司;RT-PCR 试剂盒,购自大连宝生物技术服务有限公司。

1.3 试验设计

1.3.1 引物设计及合成 利用基因库,参考 A 型 AIVM 基因和 HA 基因序列,设计并合成了两对引物。其中 XZ145-2 和 XZ146 为通用引物,可以检测所有 A 型 AIV,跨幅为 244 bp;XZ H5-1 和 XZ H5-5 为 H5 亚型特异性引物,跨幅为 860 bp。引物序列如下:

XZ145-2;5'-CTTCTAACCGAGGTCGAAAC-3'

XZ146;5'-AGGGCATTGGACAAKCGTCTA-3'

XZ H5-1;5'-ACACATGCYCARGACATACT-3'

XZ H5-5;5'-GTCCTTGCRCWGGACTMAGA-3'

(其中:Y 代 C, T;R 代表 A, G;W 代表 A, T;M 代表 A, C)

1.3.2 病原 RNA 提取 在 250 μ l 鸡胚尿囊液中加入 750 μ l Trizol RNA 抽提试剂,依照该试剂使用方法提取病毒 RNA。并按 Sambrook 方法^[5]测定 RNA 的纯度及浓度, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.3 反转录 在 2 μ l RNA 模板中分别加入 4 μ l 25mmol/L MgCl₂, 2 μ l 10 \times RNA PCR 缓冲液, 2 μ l 2.5mmol/L dNTPs, 1 μ l 40U/ μ l RNA 酶抑制剂, 1 μ l 5U/ μ l AMV RNA 反转录酶, 25pmol/L 上游引物 XZ145-2 和 XZ H5-1 各 1 μ l, 用 DEPC H₂O 补足体积至 20 μ l, 离心混匀后, 在 PCR 仪上设定程序对反转录条件进行优化。

1.3.4 多重 PCR 在 20 μ l cDNA 溶液中加入: 1 μ l 25mmol/L MgCl₂, 3 μ l 10 \times PCR 缓冲液, 0.5 μ l 5u/ μ l Taq 聚合酶, 25 pmol/L 下游引物 XZ146 和 XZH5-5 各 1 μ l, 用 dH₂O 补足总量至 50 μ l。离心混匀后, 在 PCR 仪上设定程序对该多重 PCR 的变性、退火、延伸温度和时间、循环次数等进行优化。

1.3.5 多重 PCR 产物分析 取 10 μ l 多重 PCR 产物和 2 μ l 载样缓冲液混合, 在 1% 琼脂糖凝胶上以 5V/cm 电压进行电泳, 以标准分子量作参考。

1.4 特异性试验 将 13 个 H5 AIV 分离株的 RNA, 6 个 H9 和 H7N1 AIV、NDV F48、IBVM41、ILTV、MGS6 及 SPF 健康鸡胚组织的 RNA/DNA 分别加入到该多重 RT-PCR 反应体系中, 在相同条件下进行扩增, 检测多重 RT-PCR 的特异性。其余 12 个 HA 亚型 A 型流感病毒的检测鉴别试验由本实验室的访问学者在美国宾夕法尼亚大学禽病诊断室进行。

1.5 敏感性试验 测定 H5 亚型 AIV RNA 的含量, 10 倍系列稀释后进行多重 RT-PCR, 测定多重 RT-PCR 的敏感性。

1.6 对临床样品和病毒分离物的检测 20 份分别从人工感染 H5 亚型 AIV 的病死鸡的肺、肝、脾、盲肠扁桃体、脑等组织和上呼吸道分泌物以及 13 份经细菌学检查为阴性、血清学试验鉴定为 H5 亚型 AIV 的 SPF 鸡胚分离物, 用优化后的多重 RT-PCR 进行检测, 测定其检测符合率。

2 结果

2.1 多重 RT-PCR 的建立 通过对反转录和多重 PCR 的变性、退火、延伸温度和时间以及循环次数等的优化, 最后确定反转录最佳条件为 42 $^{\circ}$ C 25 min, 96 $^{\circ}$ C 5 min。多重 PCR 的最佳循环条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 进入 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 105 s 的循环, 共循环 35 次, 然后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。

2.2 特异性试验结果 13 个 H5 亚型 AIV 分离株的 RNA 经多重 RT-PCR 扩增后, 结果均能分别在 244 bp 和 860 bp 的位置出现 cDNA 扩增带, H7N1、6 个 H9 亚型 AIV 分离株和其余 12 个 HA 亚型 A 型流感病毒的 RNA 只在 244 bp 处出现 cDNA 扩增带, 在 860 bp 处无扩增带出现; 而 NDV F48、IBV 株、ILTV、MG 及 SPF 健康鸡胚组织的 RNA/DNA 提取物在 244 bp 和 860 bp 处均无 cDNA 扩增带出现。结果见图 1。

2.3 敏感性试验结果 经测定, 该多重 RT-PCR 的通用引物 XZ145-2、XZ146 对 AIV RNA 的最低检出量为 1pg, 特异性引物 XZ H5-1、XZ H5-5 对 H5 亚型 AIV RNA 的最低检出量为 10pg。结果见图 2。

2.4 对临床样品和病毒分离物的检测结果 20 份分别从人工感染 H5 亚型 AIV 病死鸡的肺、肝、脾、盲肠、扁桃体、脑等组织和上呼吸道分泌物, 以及 13 份经血清学试验鉴定为 H5 亚型 AIV SPF 鸡胚病毒分离物用该多重 RT-PCR 进行检测, 结果均能同时扩增出两条大小分别为 244 bp 和 860 bp 和 cDNA

扩增带。

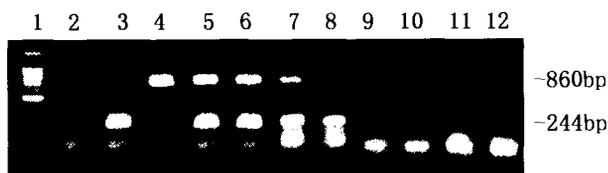


图1 多重 RT-PCR 特异性试验

1. 100bp DNA ladder marker; 2. SPF 健康鸡胚组织阴性对照; 3. 引物 XZ145-2、XZ146; 4. 引物 XZH5-1、XZH5-5; 5-6. H5 亚型 AIV; 7. H7 亚型 AIV; 8. H9 亚型 AIV; 9. NDV F48; 10. IBV; 11. ILTV; 12. MG

Fig.1 Specificity of Multi-RT-PCR for H5 Subtype AIV

1. 100bp DNA ladder marker; 2. Negative control; 3. Primers of XZ145-2; XZ146; 4. Primers of XZH5-1; XZH5-5; 5-6. H5 subtype of AIV; 7. H7 subtype of AIV; 8. H9 subtype of AIV; 9. NDV F48; 10. IBV; 11. ILTV; 12. MG

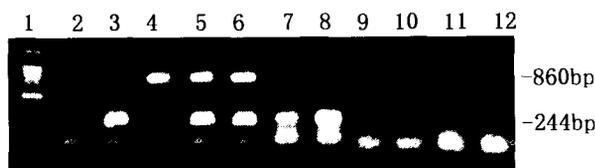


图2 多重 RT-PCR 敏感性试验

1. 100bp DNA ladder marker; 2. SPF 健康鸡胚组织阴性对照; 3. 引物 XZ145-2、XZ146; 4. 引物 XZH5-1、XZH5-5; 5. 10ng; 6. 1ng; 7. 100pg; 8. 10pg; 9. 1pg; 10. 100fg; 11. 10fg; 12. 1fg

Fig.2 Sensitivity of Multi-RT-PCR for H5 Subtype AIV

1. 100bp DNA ladder marker; 2. Negative control; 3. Primers of XZ145-2, XZ146; 4. Primers of XZH5-1, XZH5-5; 5. 10ng; 6. 1ng; 7. 100pg; 8. 10pg; 9. 1pg; 10. 100fg; 11. 10fg; 12. 1fg

3 讨 论

本试验根据多重 PCR 引物设计原则,参考 A 型流感病毒高度保守的 M 基因和 AIV 变异性很强的 HA 基因序列,设计了两对特异性引物。其中 XZ145-2、XZ146 是 A 型流感病毒的通用引物,可以检测所有 A 型 AIV; XZ H5-1, XZ H5-5 则为 H5 特异性引物,只能检测 H5 亚型 AIV。利用这两对引物,通过对多重 RT-PCR 扩增条件的优化,建

立了快速检测鉴别 H5 亚型 AIV 的多重 RT-PCR。

该多重 RT-PCR 的特异性结果显示,所有 H5 亚型 AIV 在 244 bp 和 860 bp 位置上均出现两条的 cDNA 扩增带,而 H7、H9 亚型 AIV 及其余 12 个 HA 亚型 A 型流感病毒只在 244 bp 处出现的 cDNA 扩增带,在 860 bp 处无扩增带出现。本研究所用的其它禽病原,如: NDV F48、IBV 株、ILTV、MG 及 SPF 健康鸡胚组织在 244 bp 和 860 bp 处均无扩增带出现。这表明了本研究建立的多重 RT-PCR 不但可以特异性地检测不同 HA 亚型 AIV,而且可以直接对 H5 亚型 AIV 进行检测鉴定。由于该多重 RT-PCR 不需要进行二次 PCR,在几小时内就可完成对 H5 AIV 的快速鉴定,这在对 H5 亚型 AIV,尤其是高致病性 H5 亚型 AIV 的防治上有重要意义。

AIV RNA 定量后 10 倍系列稀释进行多重 RT-PCR,通用引物 XZ145-2、XZ146 对 AIV RNA 的最低检出量为 1pg,特异性引物 XZ H5-1、XZ H5-5 对 H5 亚型 AIV RNA 的最低检测量为 10pg。结果显示该多重 RT-PCR 具有高度敏感性。

对人工感染 H5 亚型 AIV 的病死鸡的临床病料和常规血清学试验鉴定为 H5 亚型 AIV 的鸡胚尿囊液,该多重 RT-PCR 的检测结果也同样显示为 H5 亚型 AIV,其符合率为 100%,说明本研究建立的多重 RT-PCR 可以代替常规血清学鉴定方法对 H5 亚型进行快速鉴定。

参考文献:

- (1) Alexander D J. A review of avian influenza in different bird species [J]. *Vet Microbiol*, 2000, 74: 3-13.
- (2) Alexander D J. The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease [J]. *J Comp Pathol*, 1995, 112: 105-126.
- (3) Pang YS, Wang H, Girshick T, Xie Z, et al. Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents [J]. *Avian Dis*, 2002, 46(3): 691-699.
- (4) 谢芝勋, 谢志勤, 庞耀珊, 等. 应用三重聚合酶链反应同时检测 NDV、IBV、MG 的研究 [J]. *中国动物检疫*, 2000, 17(11): 20-22.
- (5) Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual* [M], 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 9880-9898.

收稿日期: 2004-08-27; 修回日期: 2004-12-29